

BIOMARKEREK SZOLID DAGANATOKBAN

Doktori tézisek

DR. NAGY ZSUZSANNA

SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Patológiai Tudományok Doktori Iskolája

Onkológia program



Programvezető

Dr. Kopper László,
egyetemi tanár, DSc

Témavezető

Dr. Tímár József,
egyetemi tanár, DSc

Szigorlati Bizottság elnöke
tagjai

Dr. Sótónyi Péter,
professor emeritus, akadémikus
Dr. Csóka Mónika,
egyetemi docens, PhD
Dr. Lővey József,
főorvos, PhD

Hivatalos bírálók

Dr. Horváth Ákos,
egyetemi docens, PhD
Dr. Szántó András,
egyetemi docens, PhD

Bíráló Bizottság elnöke
tagjai

Dr. Mandl József,
egyetemi tanár, akadémikus
Dr. Rosta András,
főorvos, PhD
Dr. Végső Gyula,
egyetemi adjunktus, PhD

B u d a p e s t , 2 0 1 2

BIOMARKEREKRŐL – ÁLTALÁBAN

A daganatok az egyén és a társadalom számára az egyik, ha nem a legfélelmetesebb ellenséget jelentik a „nyugati világban”. A félelem csak nagyon lassan oldódik, hiszen a terápiás sikereket a nehezen elfogadható sikertelenségek árnyékolják be. Ennek ellenére, ha kis lépésenként is, de érzékelhető a kezelések eredményességének javulása, ami azt jelenti, hogy egyre több közöttünk a daganatos beteg. A gyakoriság emelkedéséhez hozzájárul az életkor hosszabbodása és a korai felismerés.

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a „személyre szabott” terápia, különösen a gyógyszeres kezelés területén. Ennek alapját elsősorban a molekuláris ismeretek bővülése jelenti, olyan génhibák és hibás termékek azonosítása, amelyek a daganatok keletkezésében, növekedésében és terjedésében kulcsszerepet játszanak. Ezek a hibák jelentik azokat a célpontokat, amelyek ellen újabb és újabb gyógyszerek jelennek meg a klinikai gyakorlatban. A továbblépés több feladatot jelöl ki a ma és a holnap kutatói és klinikusai, a diagnosztikát és a terápiát végzők számára. Szerencsére a laborasztal és a betegség időbeli távolsága, megfelelő együttműködés esetén, jelentősen csökkent, ami nem kis mértékben annak köszönhető, hogy a molekuláris szintű változásokat kimutató technikák, a preklinikai tesztrendszerek, a klinikai vizsgálatok finomodnak, újabb részleteket tárnak fel, olyan összefüggéseket, információkat hordozó molekuláris hálózatokat, amelyek egyre közelebb visznek a személyre (daganatra) szabott stratégia kialakításához. Ezek között az információk között igen fontos szerep jut azoknak a molekuláknak, amelyek a biológiai/klinikai választ jelezni tudják – ezek a **biomarkerek**.

Biomarkerek (vagy ebben az esetben nevezhetjük tumormarkereknek) eddig is rendelkezésre álltak. Felosztásuk sokféle lehet. Megjelenhetnek a keringésben (zömmel ezek a labordiagnosztika klasszikus tumormarkerei), vagy kimutathatók a daganatsejteiben. Vizsgálataink néhány biomarker szerepének jobb megismerésére irányultak.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink három különböző témára irányultak, amelyeket a biomarkerek daganatos betegségekkel kapcsolatos szerepe köt össze. Az első kettő a daganatsejteiben található szabályozási zavarokkal foglalkozik, a harmadik pedig a keringésben megjele-

nő markerek aktivitását hasonlíítja össze. Az egyes témák fontosabb kérdései és célkitűzései a következők:

1. Mennyire tükröződik beteganyagunkban (vastagbélrákok) a KRAS anti-EGFR kezeléssel kapcsolatos prediktív szerepe?
2. Milyen összefüggés található a különböző szabályozási zavarok és a betegek túlélése között, azaz melyik marker vagy markercsoport rendelkezik prognosztikai szereppel?
3. A daganatokhoz gyakran társuló véralvadási zavar kapcsán keletkező szabályozók/tényezők képesek-e jelezni – legalább a jelenlegi biomarkerek hatékonyságával – a betegség prognózisát?

KRAS MUTÁCIÓK VASTAGBÉLRÁKOKBAN

A vastagbélrákok klinikai ellátásának alapjául napjainkban is olyan klinikopatológiai tényezők szolgálnak, mint a TNM stádium, a szövettan, a sebészi szél épsége és a beteg állapota. Ehhez csatlakozhat még a szövettan alapján a lymphoid invázió jelenléte, a peritoneum érintettsége és a differenciáltság foka, olyan klinikai eseményekkel, mint az elzáródás vagy a perforáció a diagnózis idején (ASCO rizikótényezők). Az utóbbi időben számos olyan fehérjét és genomikai biomarkert írtak le, amelyek finomíthatják prognosztikai információinkat és pontosabbá tehetik azoknak a betegeknek a kiválasztását, akik adott szisztémás kezelésből a legtöbb előnyt élvezhetik. Ezek közé a markerek közé tartozik vastagbélrákok esetében a KRAS (Kirsten RAS), amelynek mutációi EGFR-gátló monoklonális antitestek esetében prediktív értékkel rendelkeznek.

Az EGFR fokozott termelését sok tumor esetében rossz prognosztikai jelnek találták. Részben ennek alapján feltételezték, hogy az EGFR hibái (mutáció, amplifikáció, génkópiaszám-változás) miatt a vastagbélrákok reagálhatnak EGFR-t gátló szerekre. A klinikai hatékonyság monoklonális antitestek esetében (cetuximab, panitumumab), főleg kombinációban – előrehaladt, metasztatikus esetekben – be is következett, míg a kis molekulású, a receptor tirozin-kináz részét gátló szerek esetében nem. A klinikai hatás magyarázata azonban még várat magára, mert kiderült, hogy az immunhisztokémiailag kimutatott EGFR-mennyiség nem megfelelő markere a várható klinikai aktivitásnak. Ezzel ellentétben, prediktívnek bizonyult a KRAS aktiváló mutációja, mert ennek jelenlétében az EGFR gátlása eredménytelen, a mutáns KRAS ugyanis

függetleníti magát a jelút felsőbb részeitől, így az EGFR-től is. Napjainkban az anti-EGFR monoklonális antitestek adásának feltétele az EGFR jelenlétének kimutatása mellett elsősorban az, hogy a daganat vad típusú KRAS-t hordozzon.

Saját vizsgálatok

47 beteg adatai és mintái álltak rendelkezésre. A markerek meghatározása vagy a primer tumorból, vagy a metasztázisból történt (ugyanazon beteg primer és metasztatikus tumorát három esetben vizsgáltuk). Az EGFR-aktivitást immunhisztokémiával (Szent Imre kórház, Patológiai Osztály), a RAS-mutációt szekvenálással (KPS Kft) határozták meg. Két esetben a vizsgálat a mintában levő kevés daganatsejt miatt eredménytelen volt. (Az első minta vizsgálatára KRAS mutáció irányába 2010. március 4-én került sor.)

A betegek klinikai jellemzői – 45 értékelt beteg közül 29 férfi (életkor: median 66 év, szélső értékek 37-73), 16 nő (59 év, 47-76). Az operábilis betegek adjuváns, az előrehaladt, metasztatikus állapotban lévők palliatív terápiában részesültek. A leggyakrabban alkalmazott protokollok: de Gramont, FOLFOX, FOLFIRI, capecitabin, bevacizumab + FOLFIRI.

Anti-EGFR kezelés – Anti-EGFR kezelésre szinte kivétel nélkül többszörös kemoterápiás ciklus után került sor ECOG 0-2 állapotú betegeken, EGFR és KRAS meghatározás után. A betegeknél anti-EGFR kezelés csak vad típusú KRAS-t hordozó tumor és kimutatott metasztázisok esetén került sor, cetuximab + FOLFIRI kombinációval, vagy panitumumab monoterápiával. A cetuximab alkalmazott dózisa: 400 mg/m² testfelület telítő dózis, majd 250 mg/m² testfelület fenntartó dózis, hetente; a panitumumab alkalmazott dózisa: 6 mg/tskg, 2 hetente. A kezelés progresszióig vagy nem kívánatos mellékhatások jelentkezéséig történt. Utóbbiak esetén a kezelésmentes időszak hosszabbodott meg. A leggyakoribb grade 3/4-es melléktünetként az acneszerű bőrtünetek (4 eset), és neutropenia (6 eset) jelentkezett.

A primer tumorból származó vad KRAS esetén a 11 betegből 5-nél történt anti-EGFR kezelés (4 cetuximab és 1 panitumumab). Két esetben a 6 hónapos cetuximab kezelés során regresszió alakult ki, egy esetben progresszió, két esetben a kezelés most (1-2 hónap) kezdődött. Ebben a csoportban a median élettartam (teljes túlélés: a diagnózis és a halál beállta vagy az utolsó vizsgálat között eltelt idő) 21 hónap volt (12-72 hónap). A metasztázisokból történt vizsgálat esetén 9 betegből 8 részesült anti-EGFR ke-

zelésben. Egy betegnél cetuximab adása után a májmetasztázisok operabilissá váltak, egy másik esetben 6 hónapos cetuximab kezelés során kialakult progressziót panitumumab követte, és 6 hónap után (jelenleg) a tumor regrediált. Ez a beteg mutatta a leg-hosszabb túlélést (108 hó), de az anti-EGFR kezeléskor már kiterjedt áttétei (tüdő, mellékvese) voltak. Ebben a csoportban a median teljes túlélés 45 hó (21-108) volt. *Összességében* a 13 anti-EGFR-rel kezelt betegből 11-nél lehetett a kezelést értékelni: a 6 hónapos kezelés után klinikai előny 4 esetben mutatkozott (36.3%). Ez az eredmény igen pozitívnak mondható, két megjegyzéssel: egyrészt a betegszám igen alacsony, másrészt azonban a pozitivitást támogatja, hogy nemegyszer több kemoterápiás ciklus, átmeneti regressziók után bekövetkező progressziónál (2-3. vonalban) történt az anti-EGFR kezelés.

A KRAS mutációt hordozó esetekről – A primer tumorból történt meghatározásnál 19 beteg hordozott KRAS mutációt, ami az összes eset 63.3%-a (19/30 eset). Az arány még magasabb a vastagbélrákból (táblázatban: colon) származó mintáknál (13/18, 72.1%). Feltűnő, hogy a 19 mutáns betegből 15 férfi és 4 nő. A metasztázisokból történő meghatározásnál az arány változott (6/15, 40%), a májmetasztázisok esetében még inkább (2/7, 28.6%). Az aktiváló mutációk típusai megoszlanak. A kis mintaszám ellenére azonban az megállapítható, hogy gyakori a G13D, amiről az irodalom újabban azt feltételezi, hogy anti-EGFR monoklonális antitestekre reagál.

MEGBESZÉLÉS – Bár a KRAS vizsgálata alapján meglehetősen csekély az értékelhető esetszám, néhány megfigyelés említést érdemel:

(a) A túlélők aránya (a vizsgált időpontban) a vad típusú KRAS-t hordozóknál 60% (12/20), a mutánsoknál 52% (13/25). A közeli értékek arra utalnak, hogy a KRAS status nem befolyásolja a túlélést (azaz önmagában nincs prognosztikai szerepe), azonban éppen az anti-EGFR-rel történt kezelés – a KRAS predikciójára alapozva – befolyásolhatja az arányokat.

(b) A 45 értékelt betegből feltűnően magas a mutánsok aránya (55.5 %, 25/45), mások tapasztalatai 35-45% között mozognak. Az arányt emelhetik a tüdőmetasztázisok, mert ezeknél a betegeknek gyakoribb a mutáció. Utóbbi arra utal, hogy KRAS-mutáns primer vastagbélrákoknál még nagyobb figyelmet kell fordítani az esetleges tüdőáttétek korai felismerésére. Némileg fordított a helyzet a májmetasztázisoknál, ahol gyakoribb a vad típusúak aránya (71.5%). A vizsgált esetek közül háromnál értékeltük a primer tumort és a metasztázisait, és mindhárom esetben egyezést mutattunk ki.

(c) Az anti-EGFR kezelés második – sokszor többedik – vonalban is klinikai előnyt (regresszió, operabilitás) ért el a vad típusú KRAS-t hordozó betegek 36.3%-ában. Bár megfelelő kontrollcsoport nem áll rendelkezésre, az valószínűsíthető, hogy az eredmények első vonalbeli kezelés esetén, szelektált betegeken, még jobbak lehetnek.

(d) A mutánsok között a legtöbb a G13D mutációt hordozta, amely újabb tapasztalatok szerint érzékeny lehet anti-EGFR kezelésre. Erre vonatkozóan követhető nemzetközi ajánlás még nincs.

JELÁTVITELI UTAK VIZSGÁLATA

A tumormarkerek azonosítását nehezíti a daganatok növekedésével párhuzamosan felhalmozódó szabályozási zavarok sokasága (ma kb. 100 gént tesznek „felelőssé” a daganatok kialakulásáért), a heterogenitást elősegítő szubklónok megjelenése, és a szabályozási utak sokszínűsége, egymás aktivitását befolyásoló képességük. A fentiek is indokolják, hogy igen intenzíven folyik újabb biomarkerek, biomarker „panelek” keresése, részben a már ismertek kapcsolatrendszerének figyelembevételével (ez általában kevés gént vagy génterméket érint), részben a sok száz vagy éppen ezer génből a valamilyen szempont alapján a „leggyanúsabbak kihalászásával”. A módszerek igen sokfélék lehetnek. A génszinten kimutatott változásokat sokszor a fehérjeszinten végzett igazolások (validálás) igyekeznek közelebb hozni az alkalmazhatósághoz. Utóbbiak között találjuk az immunhisztokémiai módszereket is, amelyek számos előnnyel (a kimutatáshoz alkalmazott antitestek sokszor elég specifikusak és szenzitívek) és hátránnyal (a minták igen változó „előkészítése” – formalinfixálás, antigénfeltárás, vagy a kiértékelés szubjektivitása miatt) rendelkeznek. Némileg segít a problémákon a szöveti mikroarray (tissue microarray, TMA), amelynél sok mintán azonos blokkba ágyazva lehet elvégezni az immunhisztokémiai reakciók

Saját vizsgálatok

Immunhisztokémiai módszert alkalmazva TMA-blokkokon próbáltunk olyan szabályozót vagy szabályzó családot találni, amelyeknek a jelenléte/aktivitása (mert a jelenlét – sajnos – nem mindig jelent aktivitást is, ennek áthidalására használtunk pl. foszforilált formák elleni antitesteket) összefügg a vastagbélrákok progressziójával, a betegek túlélésével. A cél tehát ebben az esetben elsősorban a prognózissal kapcsolatot mutató biomarker(ek) azonosítása volt.

TMA – A vizsgálatokhoz vastagbélrákok (1996-2004) formalinban fixált és paraffinba ágyazott mintáit használtuk, amelyekből 3 szöveti mikroarray-t (TMA) készítettünk (Panoramic TMA Master, 3D Histech, Budapest). Minden TMA-blokk 70 db 2 mm átmérőjű hengert tartalmazott.

Betegek – Összesen 95 betegből származtak a minták (52.6% férfi és 47.4% nő), a median életkor 62 év (34-78 év). A betegek kemoterápiás kezelésére, valamint a követésükre a Szt Imre Kórház Onkológiai Profilján került sor. Az átlagos követési idő 76 hónap volt (8-181 hónap). A klinikai lefolyás jellemzésére a következő adatokat használtuk: a betegség stádiuma, teljes túlélés, progressziómentes túlélés (progression-free survival – PFS) és progresszív betegség. Ha a beteg nem a daganatos betegsége miatt halt meg, akkor a statisztikai értékelésnél nem vettük az adatait figyelembe.

Immunhisztokémia – Az immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatához 5 µm vastag metszeteket készítettünk a TMA-blokkokból. A következő fehérjékkel szembeni antitesteket használtuk:

- EGFR/RAS/PI3K út – *EGFR* (DX, Ventana, Zymed, NC384, pY1068, pY1173), *HER2* (SP3), *RAS* (AB1), *RAF* (pRAF-9421), *MAPK* (4376), *ERK1/2* (pMEK1/2-2338), *AKT* (pAKT, panAKT), *mTOR*, *PTEN* (Ab-6)
- Egyéb ligandok/receptorok – *MET* (NCL-cMET-S), *PDGFRa*, *PDGFRb*, *STAT2* (RB-10458-P0), *STAT3* (RB-9237-P0), *IGFR*
- Sejtciklusszabályzók – *ciklin D1* (RM-9104-S0), *ciklin D3* (MS-215-P0), *Ki67* (N1633)
- Apoptózis-szabályzók – *p53* (DO7, FP2-3, SP5), *Bax* (Ab-1), *Bad* (75, RB10376-P19; 99, RB10377-P1), *Bcl-2* (Ab-3), *citokróm C* (Ab-2), *kaspáz 8* (Ab-4), *FLIP* (Ab4042), *survivin*, *NFκB* (p50, Ab-2; p65, RB-1648-PO)
- Adhézió/invázio – *E-kadherin* (MS-1479-S0), *β-katenin* (MS-1763-S0), *CD44v6* (Ab-1), *CD138* (syndecan-1), *MMP2* (RB-9233-PO)
- Egyéb – *CD10* (CALLA, Ab-2, MS.728-S0), *Cox2*, *HLA-DR*, *timidilát-szintáz* (MAB4130)

A kiértékelést 3 patológus végezte, egymástól függetlenül, egyeztetett szempontok szerint. Jelentős eltérés esetén konzultatív értékelésre került sor. Minden mintát és reakciót részben a pozitívnak ítélt sejtek aránya, részben a reakció erőssége alapján egy számmal (0-9) jelöltünk, amit egyben a reakció aktivitásának tekintettünk. A TMA-

készítés, az immunhisztokémia végzése és értékelése a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt (*dr. Micsik Tamás, dr. Fónyad László, dr. Krenács Tibor*).

Statisztikai értékelés – Mind a klinikai adatok, mind az immunhisztokémiai eredmények kiértékeléséhez a Statistica 9.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) és MedCalc (1.2.1.0.; MediCals Software, Mariakerke, Belgium) szoftvereket használtuk.

EREDMÉNYEK – Összefüggést kerestünk a vizsgált szabályozók egymás közötti aktivitása, valamint az aktivitások és a klinikai jellemzők között.

Összefüggés azonos szabályozók aktivitása között különböző antitestek esetén – Erősen szignifikáns összefüggést ($R > 0.7$) a következő antitestek között találtunk:

- (a) az EGFR két foszforilált formáját kimutató antitestek között (89 eset alapján, 0.74),
- (b) a p53-at kimutató három antitest között (30 eset, 0.85–0.87),
- (c) a fenti két csoport között (30 eset, 0.74–0.82),
- (d) az EGFR-t kimutató Pharm-DX és Ventana antitestek között (23 eset, 0.76).

Összefüggés az egyes szabályozók aktivitása között – Erősen szignifikáns összefüggést ($R > 0.7$) a következők között találtunk:

- (a) a p53 és a pEGFR között (34 eset, 0.78),
- (b) az NF κ B p65 és a survivin aktivitása között (32 eset, 0.76),
- (c) a panAKT és NF κ B vagy PDGFB közötti erős összefüggés (0.88) azonban csak néhány esetre (8 és 7 eset) szorítkozott.

Összefüggés a klinikai adatok és az IHC aktivitások között – Az adatok értékelésekor az IHC reakciók aktivitása alapján két csoportot képeztünk: erős aktivitású minták (megfelel a 7-9 értékkel jellemezetteknek) és gyenge aktivitás (0-3), míg az átmeneti értékeket (4-6) mutató mintáktól eltekintettünk. Kritériumként szabtuk meg, hogy még ezen belül is csak azokat a szabályozókat vesszük figyelembe, amelyeknél legalább 8 eset értékelhető volt, és az értékelés alapján legalább 70%-uk tartozott az erősen vagy gyengén aktív csoportba. A minták IHC-értékei és a klinikai jellemzők, elsősorban a progresszióval kapcsolatosak, kevés összefüggést mutattak. Az EGFR (Ventana) antitesttel kapott eredmények azok, amelyek elég egyértelműen utalnak arra, hogy a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban a normális bélhám proliferációjának szabályozási menetrendjének elemei ismerhetők fel. Ezt erősíti, hogy az össz túlélés és a progressziómentes túlélés esetén is az EGFR mellett az általa befolyásolt út résztvevői

(RAS, RAF, ERK) jelennek még meg gyakrabban. Önmagában tehát az EGFR expressziója nem jelent rossz prognózist (mint ahogy nem jelent pl. tüdőrák esetében az EGFR-mutáció). Valószínű, hogy vastagbélrákoknál a szabályozás normális gátlói (pl. szuppresszorgének) mondanak csődöt. A STAT3 szerepének tisztázása – amely ugyancsak kapcsolatban van az EGFR-úttal – további vizsgálatot igényel.

ÖSSZEFÜGGÉS AZ IHC MINTÁK AKTIVITÁSA ÉS A PROGRESSZIÓ KÖZÖTT

	<i>Erős aktivitás</i>	<i>Gyenge aktivitás</i>
<i>Össztúlélés</i>		
>10 év	EGFR(V), BAX	–
6-10 év	EGFR(V), RAS, STAT3, NFκB	CD44v6
3-5 év	EGFR(V), RAS, BAX, p53, kaszpáz-8, E-kadherin, survivin	CD44v6
0-2 év	EGFR(V), ERK, RAF	–
<i>PFR (progressziómentes túlélés)</i>		
>6 év	EGFR(V), RAS, STAT3	CD44v6
3-5 év	–	
1-2 év	EGFR(V), ERK, RAS	CD44v6
0-1 év	EGFR(V)	–

A daganatsejtek terjedését befolyásoló markerek közül az E-kadherin a hosszabb túléléssel, a CD44v6 a rosszabb prognózissal társult, ami egybehangzik az eddigi megfigyelésekkel. Az apoptózist jellemző markerek (pl. BAX, p53, kaszpáz-8, survivin, NFκB) nem mutattak jellemző képet a progresszióval kapcsolatban.

MEGBESZÉLÉS – A vizsgálatok első része a szabályzók (potenciális markerek) IHC-vel értékelt aktivitását egymással hasonlította össze. Tapasztalataink szerint a 6 EGFR-t kimutató antitest egymáshoz igen közeli aktivitást mutatott. A legszorosabb kapcsolatot a PharmDX és Ventana, valamint a foszforilált antitestek között találtuk. Mivel a foszforilált állapot a jelenlét mellett a funkcióra is utal, ezért ezek alkalmazása javasolható az EGFR meghatározására. Hasonlóan jó egyezést mutattak a p53 elleni antitestek. Bár az általánosításhoz kevés az adat, valószínű, hogy az IHC-nél alkalmazott reakciók elég megbízhatóan mutatják ki a kérdéses markereket.

A vizsgált betegek konvencionális kemoterápiában résesültek, és a daganatsejtek terápia adott válaszában – a jelek szerint – nem az EGFR-út volt a meghatározó (leg-

alábbis nem az egyetlen). Az a tény, hogy jelenleg a KRAS vad típusát hordozó esetekben az anti-EGFR monoklonális antitestekkel (cetuximab, panitumumab) végzett kezelések klinikai eredménye – az összes vastagbélrákot tekintve – csak 10–20%, jelzi egyéb terápiás választ befolyásoló események jelenlétét. Ezen a téren feltehető az esetek közötti jelentős heterogenitás magyarázhatja azt, hogy statisztikailag szignifikáns marker család, a progresszió szempontjából alig jelölhető meg, mert egy-egy szabályozó ritkán éri el az értékelési – azaz az előfordulási – küszöböt. Az ugyancsak valószínűsíthető, hogy a progresszióval járó heterogénné válás előtt, amikor még feltehetően az EGFR-út a későbbiekben jobban befolyásolja a tumor növekedését, az anti-EGFR-út (nem feltétlenül csak anti-EGFR) elleni terápiás támadás eredményesebb lehet.

VÉRALVADÁS ÉS A DAGANATOS PROGRESSZIÓ

Az első leírások óta többszörösen megerősítették, hogy kétirányú kapcsolat áll fenn a VTE (véna trombóza) és a daganatok között. Egyrészt a daganatos betegekben fokozott a VTE rizikója (7-28-szorosa), különösen a diagnózis utáni első néhány hónapban és távoli metasztázisok esetén; és fordítva, a daganat keletkezésének nagyobb az esélye az idiopátiás VTE első epizódját követő 2 éven belül. Hospitalizált daganatos betegeken a VTE a második leggyakoribb halálok, minden hetediknél tüdőembolia lép fel. A műtét ugyancsak emeli a rizikót.

Daganatos betegekben sok olyan tényező fokozhatja a koagulációs aktivitást (pl. TF, uPA, CP), amelyek rezisztensek a normális antikoagulációval szemben. A daganat növekedésével a koagulációs kaskád aktiválása fokozza egyben a fibrinolitikus rendszer aktivitását is. Ennek egyik markere a plazmában a D-dimer (DD) szint emelkedése, amely egyben jelzi a trombus- és az emboliakeletkezés esélyének növekedését.

Tumoros (és nem tumoros) betegeken a trombózis kialakulásának megelőzésére és kezelésére leginkább elterjedt eszköz a nem frakcionált heparin (unfractionated heparin – UFH, illetve újabban származékai, az alacsony molekulásúlyú heparinok (low molecular weight heparin – LMWH).

Az utóbbi időben felmerült, hogy a heparin és az LMWH-k a trombózist megelőző hatásuk mellett javíthatják a daganatos betegek túlélését. A preklinikai adatok szerint ez a hatás a metasztázisgátláson keresztül érvényesülne, de ennek a mechanizmusa nem ismert. Valószínű, hogy a tumorelles hatása független a hemosztázisra gyakorolt ha-

tástól, bár a heparin sok olyan kapcsolattal rendelkezik, amelyek a metasztázis-képződésben fontosak lehetnek. Ilyen partnerek lehetnek enzimek (pl. a heparináz), adhéziós molekulák (pl. P- és L-szelektin), növekedési faktorok, citokinek. A heparin/LMWH ebben az esetben megnehezítheti vagy meggátolhatja azt, hogy a tumorsejtek megvédjék magukat pl. a keringésben trombocita- vagy fibrinköppennyel, vagy gátolhatja kitapadásukat az endotélsejteken (és így az extravazációt). A heparin/LMWH hatása a lokálisan növekedő tumorra még kevésbé ismert, amit feltételeznek az az, hogy ezen a téren az angiogenezis gátlása lenne igen fontos.

Saját vizsgálatok

A következőkben két vizsgálat megfigyeléseiről számolunk be.

1. VIZSGÁLAT

Betegek, kezelés – A randomizált, nyílt, retrospektív vizsgálatban LMWH-val kezelt és nem kezelt szolid daganatos – szinte kizárólag emlőrákos és vastagbélrákos – betegeket értékeltünk (96 beteg – 62 emlőrák, 29 vastagbélrák, 5 petefészekrák). Az LMWH-kezelés nadroparinnal (Fraxiparin) történt a kemoterápiás kezelés alatt, illetve a ciklusok között, legalább 6 hónapig. Az LMWH-t sc. kapta a beteg, naponta egyszer, a testtömeg alapján számított dózisban.

A vizsgálat célja – a betegeknél a progressziómentes és a teljes túlélés értékelése (utóbbi a kezelés kezdete és a halál beállta vagy az utolsó vizit ideje közötti időt jelenti). A betegség stádiumát a TNM-rendszer alapján állapítottuk meg.

EREDMÉNYEK – Az LMWH-kezelt betegek közül azoknál mutatkozott statisztikailag előnyös hatás, azaz hosszabb túlélés, akiknél a primer tumor T3 vagy T4 stádiumban volt. A nyirokcsomók érintettsége (N) nem okozott eltérést a két csoport között. M0 vagy M1 stádium mindkét csoportban előfordult. Meglepetésre, az LMWH-kezelés hosszabb túléléshez vezetett akkor, ha a betegeknél a kezelés kezdetekor már kimutatható(k) volt(ak) a metasztázis(ok) (kivéve a központi idegrendszert) (M1 stádium).

Az átlagos követési idő 4.9 év volt. A diagnóziskor észlelt klinikai állapothoz képest bekövetkező változást – regresszió, progresszió, változatlan állapot – képzőkével és markerekkel értékeltük. A vizsgált időszak végén (az utolsó kórházi vizit vagy az elhalálozás időpontja) az LMWH-val kezelt betegeknél 32.3%-ban alakult ki progresszió, a kontrollcsoportnál 50.7%-ban. A progressziómentes túlélés átlaga 35 hónap volt a kezelt és 26 hónap a kontrollcsoportban, míg regresszió (tumortömeg 25%-nál na-

gyobb csökkenése) 12.5%-ban, illetve 3.1%-ban fordult elő. Klinikai változás nem következett be a betegek 55.2%-ánál az LMWH-kezelt, illetve 46.2%-ban a kontroll csoportban.

2. VIZSGÁLAT

Betegek – Összesen 299 – emlőrákban, vastagbélrákban, pancreasrákban és petefészekrákban szenvedő – beteget választottunk be random abba a retrospektív vizsgálatba, amelynek elsődleges célja az LMWH-kezelés hatásának, valamint a D-dimer, mint potenciális prognosztikai faktor vizsgálata volt.

Markerek – A tumormarkereket – CEA, CA125, CA15-3, CA19-9 –, valamint a hemosztázis jellemző tényezőit rutin laboratóriumi módszerekkel mértük (a vizsgálatokat a kórház Központi Laboratóriuma és Patológiai Osztálya végezte).

Kezelés – Tromboprofilaxishoz a betegek nadroparint, enoxaparint (Clexane, Sanofi-Aventis) vagy dalteparint (Fragmin, Pfizer) kaptak. Az LMWH-t a betegek az adjuváns terápia (rendszerint a 6 hónapos ciklus) során, majd ezután 3 hónapig, vagy a palliatív kezeléskor (a kemoterápiával párhuzamosan) kapták. Terápia okozta szövődmény csak 4 esetben fordult elő. A kemoterápiás kezelés a megfelelő standard protokollok szerint történt.

EREDMÉNYEK – A vizsgált esetekben az életkor értékei a szokásosakat mutatták. Az sem meglepő, hogy a pancreasrákok több mint 80%-a előrehaladt vagy metasztatikus, inoperábilis állapotban került felismerésre, ez tükröződik a rövid túlélésben is. Bár az emlőrákok zöme a diagnóziskor az I/II. stádiumban volt, a késői felismerés aránya magas (több mint az esetek negyede), ami szűrési problémákra hívja fel a figyelmet.

Összefüggés az LMWH-kezelés és a hemosztáziszavarok között – Hemosztáziszavar (vénatrombózis, embolizáció) az LMWH-val kezelték között 11.5%-ban (24/208) fordult elő (15.8%-ban, ha az arteriás trombózisokat és embolizációt is értékeljük). Lényeges különbségek mutatkoztak az egyes tumortípusok között (pl. emlőráknál 6.6 % – legalacsonyabb érték, pancreasráknál 22.7 % – legmagasabb érték).

Kérdés, hogy van-e kapcsolat a fenti adatok és a D-dimer (továbbiakban DD) szintje között, hiszen a DD-szint elvileg a fokozott koagulációs állapotot tükrözi. Ha minden daganatos esetet együtt értékelünk, akkor az emelkedett DD-szint sokkal rosszabb prognózt jelzett, mint a normális szint (élők / halottak aránya: 30.1% versus 88.4%) a 12 éves értékelési periódus alatt.

Összefüggés az LMWH-kezelés, a DD-szint és a túlélés között – A túlélés értékelésekor (2011. november) csak azokat a betegeket vettük figyelembe, akiknél a diagnózis 2000. január és 2009. decembere között történt. Ezért a betegeket két csoportra osztottuk a túlélés szempontjából, azokra, akik kevesebb, mint két évvel éltek túl a diagnózist (<2 év), és azokra, akik több mint 2 évvel (>2 év). Az összes LMWH-kezelt beteg adatát tekintve nem volt különbség a két csoport között. Ezt mutatták a petefészekrákos és a vastagbélrákos esetek, míg emlőráknál a betegek 76.5%-a, pancreasráknál pedig csak 26.0%-a került a hosszabban túlélők közé. Utóbbiak szoros összefüggést mutatnak a daganatok előrehaladt stádiumával a diagnózis idején. A DD-szint esetén a hosszabb túlélés egyformán jelentkezett az emelkedett és normális értékeket mutató esetekben, mind az összes esetet együtt értékelve, mind az egyes tumortípusoknál, a pancreasrákokat kivéve.

A stádium a tumor progresszióját jelzi. Az LMWH-val kezelték között a DD-szint emelkedése sokkal gyakoribb volt az előrehaladottabb, mint a korábbi stádiumban, így ezek az értékek a rosszabb prognózisra utaltak. A különbségek szignifikánsnak bizonyultak. Az ellenkezőjét találtuk a korai stádiumokban, ahol a normális DD-szintek a jobb prognózis mellett szóltak. Mindez arra utal, hogy a DD-szint potenciális prognosztikai marker.

Összefüggés a „klasszikus” tumormarkerek és a DD szintjei között – A vizsgálatba bevont tumorok esetében mindennapos a markerek használata, elsősorban a progresszió megítélésére, ami egyben tükrözi a terápia eredményességét is, végső soron prognosztikai információt hordoznak. Az értékelt eseteknél részben a diagnóziskor mért értékeket vettük figyelembe, részben a betegség lefolyása során észlelteket.

A vizsgálatból az alábbi következtetéseket vontuk le.

(a) A pancreasrákok és a petefészekrákok esetében az emelkedett DD-szint gyakorisága hasonló volt a klasszikus markerekéhez (pancreasrák: CA19-9, petefészekrák: CA125/CEA), viszont sokkal gyakoribb volt vastagbél- és emlőrákok esetében a szokásos markereknél (vastagbél: CEA, emlőrák: CA15-3/CEA).

(b) Ugyanezt a tendenciát lehetett megfigyelni a stádiumokkal jellemzett progresszió során.

(c) Előfordult, hogy a klasszikus markerek és a DD szintjei együtt emelkedtek, vagy maradtak normális szinten, de ennek az együttes változásnak a gyakorisága messze nem érte el az összes esetet.

(d) Az értékelés szerint emlőrákok és petefészekrákok esetében a CEA meghatározása feleslegesnek látszik.

MEGBESZÉLÉS – Az LMWH-k (és a heparin) véralvadást gátló hatásuk mellett több megfigyelés szerint daganatellenes hatással is rendelkezhetnek. A tumorgátlás érvényesülhet lokálisan (erre utalnak az 1. kísérlet eredményei – gátlás a primer tumor és a metasztázis növekedésében), és a progresszió során egyaránt. Utóbbi elsősorban a metasztatizálás gátlását jelentené, amely azért látszik elfogadhatónak és magyarázhatónak, mert az LMWH-k képesek megakadályozni a véralvadási kaszkádot, ezzel pl. a tumorsejtcsoportokat a keringés és immunrendszer ártalmaival szemben védő fibrin-köpeny kialakulását. A gátló hatás sejtszinten is érvényesülhet, elsősorban a trombociták és az endotélsejtek koagulációt elősegítő hatásának kikapcsolásával. A tumorok lokális növekedésének befolyásolását elsősorban az angiogenezis gátlásán keresztül érhetik el az LMWH-k, de ezen a téren is ellentmondások a megfigyelések. A magyarázat azért is nehéz, mert az angiogenezisnek több formája létezik, és ezek eltérő terápiás támadáspontokat jelentenek.

Elsősorban a terápia megválasztásának szempontjából nagyon fontos a betegséget különböző szempontból megbízhatóan jellemző markerek használata (diagnosztikai, prediktív, prognosztikai markerek). Ilyen markerekkel rendelkezünk ugyan, azonban hatékonyságuk, amelyet az érzékenységgükkel (szenzitivitás) és specifitásukkal érnek el, már sok kívánnivalót hagy maga után. Feltételeztük, hogy ha a szervezetben a koagulációs állapot a tumornak kedvez, akkor az ezt jelző markerek közül pl. a D-dimer is „viselkedhet” markerként. Erre utalt az, hogy – az összes tumort figyelembe véve – a DD emelkedett szintje rossz prognózissal párosult. A tumortípusokat tekintve az emelkedés leggyakrabban petefészekrák eseteiben volt kimutatható, legritkábban emlőráknál. Ezek az adatok indokolták azt, hogy a DD-szint emelkedését az egyes tumortípusokban széles körben használt markerekkel hasonlítsuk össze. Ez az összehasonlítás azért is indokolt, mert a jelenlegi markerek hatékonysága enyhén szólva nem megfelelő, illetve megfelelő bizonyos határok között, amelyekkel alkalmazásuk során tisztában kell lenni. Csak példa, hogy még a petefészekráknál alkalmazott CA125 is a korai esetek csak kb. felében (a mi vizsgálatainkban 34.0%-ban) emelkedett. Ezért további markereket kerestek és azonosították a HE4/WFDC2-t, amely a CA125-tel kombinálva emeli a prognózis megítélésének pontosságát. Saját, 2. vizsgálatunkban, nagyon hasonlóan, a DD-szint azonosan vagy jobban emelkedett a daganatnövekedés korábbi, majd a későbbi stádiumaiban, mint a klasszikus markerek. A

pancreasrák kivételével (amelyet smajdnem mindig a késői stádiumban fedeztek fel) a többi tumornál (emlőrák, vastagbélrák, petefészekrák) a DD-szint prognosztikai markereknek mutatkozott. Vizsgálatunk arra is rámutatott, hogy pl. emlőráknál és petefészekráknál nem indokolt a CEA meghatározása.

Az új és pontosabb markerek vizsgálata kiterjedten folyik, nem egyszer többszörös markerek, azaz marker-profil meghatározásával (ilyen pl. emlőrákoknál az Oncotype DX, vagy a Mammaprint – de hasonlóak már más tumortípusnál is megjelentek). A DD-szint prognosztikai képessége azért is jelentős, mert költséghatékonyság tekintetében igen kedvező lenne.

ÖSSZEFOGLALÁS

A biomarkerekkel kapcsolatban végzett vizsgálataink során az alábbi főbb megállapításokra jutottunk.

1. Az anti-EGFR-kezelés második, sokszor többedik vonalban is klinikai előnyt (operabilitás, regresszió) ért el a vad-típusú KRAS-t hordozó betegek 36%-ában. A KRAS mutások között a G13D mutáció volt a leggyakoribb, amely újabb tapasztalatok szerint még érzékeny lehet anti-EGFR kezelésre.
2. Vastagbélrákminták immunhisztokémiai (IHC) vizsgálata (TMA-val) arra utalt, hogy az IHC értékek és a klinikai – elsősorban progresszióval kapcsolatos – jellemzők között kevés a kapcsolat. Az EGFR elleni antitesttel kapott eredmények szerint a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban – a túlélés hosszától függetlenül – a normális bélhám proliferációjának szabályozása működik. Ezt erősíti, hogy az EGFR mellett elsősorban az általa befolyásolt út elemei jelennek meg (RAS, RAF, ERK, STAT3). A különbséget a szabályozás gátlóinak funkcióvesztése jelentheti, illetve más génhibák jelenléte.
3. A D-dimer szintje azonos vagy jobban emelkedett a daganatnövekedés korábbi stádiumaiban, mint a klasszikus markereké. A vizsgált daganattípusoknál (emlőrák, vastagbélrák, petefészekrák) a D-dimer szintje prognosztikai markereknek mutatkozott, és meghatározása ajánlott a klasszikus markerek mellett – utóbbiak között viszont a CEA meghatározása pl. emlőráknál és petefészekráknál nem indokolt.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓK

Nagy, Zsuzsanna: Daganatok és hemosztázis. *Pathol Oncol Res Suppl* 2, 9-14, 2007

Nagy, Zsuzsanna, Vera Turesik, György Blaskó: The effect of LMWH (Nadroparin) on Tumor Progression. *Pathol Oncol Res* 15, 689-692, 2009. **IF: 1.152**

Nagy, Zsuzsanna, Orsolya Horváth, Julia Kádas, Dorottya Valtinyi, Larisza László, Benke Kopper, György Blaskó: D-dimer as a potential prognostic marker. *Pathol Oncol Res* DOI: 10.1007/s12253-011-9493-5. **IF: 1.483**

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Tallós Imre, Vargha Géza, Pölöskey Anna, Nagy Zsuzsanna, Kricskovits Ágota: Citosztatikus kezelések (CMF) szövödményeként kialakuló alveolitisek (pneumonitisek). *Orvosi Hetilap* 128, 1621-1622, 1987

Moskovits Katalin, Nagy Zsuzsanna: Előrehaladott daganatos betegségben szenvedők fájdalomcsillapítása orális retard hatású morfinkészítménnyel, M-Eslonnal. *Gyógyszereink*, 1995

The ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised Trial. *The Lancet*, 359, 2131-2139, 2002. (Nemzetközi trial eredménye)

Dank Magdolna, Zergényi É, Torgyik László, Nagy Zsuzsanna: Az emlőrák kemoterápiája. In: *Onkofarmakológia*. Szerk: Jeney András, Kralovánszky Judit. *Medicina*, 2005, 679-714.

Nagy, Zsuzsanna: Zolderonic acid (ZOMETA) a significant improvement in the treatment of bone metastases. *Pathol Oncol Res* 11, 186-187, 2005. **IF: 1.162**

Nagy, Zsuzsanna: Emlőrák hormonterápiája premenopauzában levő betegeken. *Pathol Oncol Res Suppl* 3, 1-7, 2007.

Kopper László, Nagy Zsuzsanna: Biszfoszfonátok hatása a csontokra és a csontokon kívül. *Pathol Oncol Res Suppl* 1, 2-5, 2007.

Nagy Zsuzsanna: Emlőrákos betegek kezelése fulvesztranttal – lehetne hatékonyabb? *LAM* 20, 733-736, 2010.

Nagy Zsuzsanna: Gyógyszeres terápiák. Medical Tribune 22, 11, 2010.

Nagy Zsuzsanna: Az emlőrák kezelésének újabb eredményei. Orvostovábbképző Szemle 17, 10-13, 2010.

Kopper László, Timár József, Becságh Péter, Nagy Zsuzsanna: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009

Kopper László, Timár József, Becságh Péter, Nagy Zsuzsanna: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. 2. kiadás, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011

Nagy Zsuzsanna: Célzott terápia. In „Gyakorlati onkológia és onkohematológia.” Szerk: Dank M, Demeter J. Vox Medica Kiadói Kft, 2012, előkészületben